

白三叶叶片水浸提液对几种园林植物的化感作用

郑洁¹, 刘芳¹, 吴兴波¹, 许改平¹, 丁倩倩¹, 高岩², 张汝民²

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 采用砂培法研究了不同质量浓度白三叶 *Trifolium repens* 叶片水浸提液对一串红 *Salvia splendens*, 香雪球 *Lobularia maritime*, 石竹 *Dianthus chinensis*, 高羊茅 *Festuca arundinacea* 和马蹄金 *Dichondra repens* 等幼苗生长、根系活力、叶绿素质量分数以及抗氧化保护酶活性的影响, 并采用气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用技术对白三叶叶片水浸提液化学成分进行了分析。结果表明: 白三叶叶片水浸提液对一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金幼苗生长有明显的影响, 其中, 50 g·L⁻¹ 白三叶叶片水浸提液处理 5 种园林植物幼苗, 对其生长指标有极显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 其幼苗根系活力分别降低了 24.0%, 42.8%, 51.6%, 16.1% 和 14.9%, 幼苗叶绿素质量分数分别下降了 13.6%, 43.1%, 30.5%, 57.1% 和 13.8%。当处理质量浓度为 25 g·L⁻¹ 时, 对 5 种园林植物幼苗体内过氧化物酶 (POD), 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性有显著的促进作用 ($P < 0.01$); 当白三叶叶片水浸提液质量浓度增加到 50 g·L⁻¹ 时, 对 5 种园林植物幼苗体内 POD, SOD 和 CAT 活性有极显著抑制作用 ($P < 0.01$), 同时使幼苗体内丙二醛 (MDA) 质量摩尔浓度极显著增加 ($P < 0.01$)。白三叶叶片水浸提液有 42 种化合物, 主要成分是 4-羟基-紫罗兰酮 (16.4%), 乙酸异戊酯 (11.0%), 二氢香豆酮 (9.6%), 乙烯基愈创木酚 (7.4%), 喇叭茶醇 (6.4%), 菖蒲酮 (5.5%), 麦芽酚 (4.9%), 紫罗兰酮环氧化物 (4.7%) 和 2-羟基-6-甲基苯甲醛 (4.2%), 合计占到总量的 70.1%。图 7 表 2 参 31

关键词: 植物学; 白三叶; 园林植物; 水浸提液; 抗氧化酶; 化感作用

中图分类号: S718.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2014)01-0019-09

Research of the aquatic extract from leaves of *Trifolium repens* to several garden plants

ZHENG Jie¹, LIU Fang¹, WU Xingbo¹, XU Gaiping¹, DING Qianqian¹, GAO Yan², ZHANG Rumin²

(1. School of Landscape Architecture, Zhengjiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In order to understand the interaction of *Trifolium repens* with other garden plants, we studied the effects of the aquatic extract from leaves of *T. repens* on the growth, root activity, chlorophyll content, and antioxidant defense system in seedlings of *Salvia splendens*, *Lobularia maritime*, *Dianthus chinensis*, *Festuca arundinacea* and *Dichondra repens* using sand culture method, and analyzed the chemical components of the extract using GC-MS. Results showed that the aquatic extract from leaves of *T. repens* had significant allelopathic effects on seedling growth in *S. splendens*, *L. maritime*, *D. chinensis*, *F. arundinacea* and *D. repens*. The seedling growth index in *S. splendens*, *L. maritime*, *D. chinensis*, *F. arundinacea* and *D. repens* was highly significantly inhibited ($P < 0.05$) by treatment with 50 g·L⁻¹ of the aquatic extract; the root activity in the seedlings of the five garden plants were reduced by 24.0%, 42.8%, 51.6%, 16.1% and 14.9%, respectively, and the chlorophyll content in these five garden plants were reduced by 13.6%, 43.1%, 30.5%,

收稿日期: 2013-01-04; 修回日期: 2013-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270756, 30922397)

作者简介: 郑洁, 从事园林植物栽培与管理研究。E-mail: whoami0121@sina.com。通信作者: 高岩, 教授, 博士, 从事植物化学生态和植物发育生理学等研究。E-mail: gaoyan1960@sohu.com

57.1%, and 13.8%, respectively, compared with the control. At $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the extract significantly increased the activities of peroxidase(POD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in *S. splendens*, *L. maritime*, *D. chinensis*, *F. arundinacea* and *D. repens*; when aquatic extract from leaves of *T. repens* up to $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, it reduced the activities of those enzymes in five garden plants, while significantly increased the content of malondialdehyde (MDA) in the seedling of the garden plants. 42 compounds were identified in the aquatic extract from leaves of *T. repens*. The main compounds were 4-hydroxy-ionone(16.4%), isoamyl acetate(11.0%), dihydrocoumarone (9.6%), p-vinylguaiacol(7.4%), palustrol(6.4%), shyobunone(5.5%), maltol (4.9%), ionone epoxide (4.7%), and benzaldehyde, 2-hydroxy-6-methyl-(4.2%), which all together accounted for 70.1 % of the total. [Ch, 7 fig. 2 tab. 31 ref.]

Key words: botany; *Trifolium repens*; garden plant; aquatic extract; antioxidant enzyme; allelopathy

植物化感作用是植物通过茎叶挥发、雨雾淋溶、根系分泌以及植物残株的腐解等途径向环境中释放某些化学物质而影响其他有机体的化学生态学现象,包括植物、微生物和动物(受体)及自身的生长和发育。在生态系统中,植被形成和演替、农作物连作障碍、森林更新以及生物入侵等都存在着化感作用,对作物增产、森林抚育、植物保护和生物防治等方面有着广泛的影响^[1-3]。许多研究表明,化感作用是外来植物成功入侵的重要机制之一,大多数成功入侵的外来植物,如紫茎泽兰 *Ageratina adenophora*^[4],豚草 *Ambrosia artemisiifolia*^[5], 薇甘菊 *Mikania micrantha*^[6], 五爪金龙 *Ipomoea cairica*^[7], 加拿大一枝黄花 *Solidago canadensis*^[8], 香附子 *Cyperus rotundus*^[9], 矢车菊 *Centaurea maculosa*^[10-11]和银胶菊 *Parthenium hysterophorus*^[12]等都被证实具有明显的化感作用。目前,植物化感作用研究主要集中在农业、作物和林业等方面,而对园林植物化感作用的研究鲜见报道。白三叶 *Trifolium repens*, 又名白车轴草,为豆科 Fabaceae 三叶草属 *Trifolium* 多年生草本,原产欧洲和北非,19世纪从欧洲传入中国,在湿润草地、河岸、路边呈自生状态,后成为入侵杂草之一^[13]。修剪频繁、浇水量大已成为中国禾草草坪发展的限制条件,而白三叶草坪具有不需修剪,管理强度小;浇水次数少,耐粗放管理;成坪快,观赏性好等优点,可以在园林绿化中广泛应用。此外,白三叶还可以作为观花植物与一串红 *Salvia splendens*, 香雪球 *Lobularia maritime*, 石竹 *Dianthus chinensis* 等草本花卉配置在缀花草坪与花境中,与高羊茅 *Festuca arundinacea*, 马蹄金 *Dichondra repens* 等常用草坪草配置形成丰富多彩的草坪景观,打破草坪单一呆板的色调和格局,同时丰富了自然的色彩组合且增强了绿化效果和艺术欣赏价值。白三叶也具有很强的人侵性,可迅速向周边蔓延,对其他园林植物幼苗生长具有明显的抑制作用^[14]。因此,本研究采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析了三叶叶片水浸提液的组成成分,并选用不同质量浓度白三叶叶片水浸提液处理园林绿化常用植物一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金幼苗,研究其浸提液对园林植物幼苗生长、根系活力、叶绿素含量以及幼苗体内抗氧化酶活性和细胞膜受损程度的影响;从生理生化角度,探讨白三叶叶片水浸提液与园林植物生长的关系,为园林植物的配置提供新的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

试验用白三叶采于浙江农林大学植物园。2011年9月选取当年生长健康的白三叶植株上的叶片,用自来水彻底洗净,再用蒸馏水冲洗,将白三叶叶片风干后粉碎,过60目筛的粉末储藏备用。受试植物为一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等种子由浙江虹越花卉有限公司提供。

1.2 研究方法

1.2.1 白三叶叶片水浸提液制备 准确称取白三叶叶片干粉5g,置于三角瓶中,加入100mL蒸馏水,在25℃条件下浸提48h(隔12h摇动5min),再经4000r·min⁻¹离心15min,取上清液,然后过滤,第1次用定量滤纸过滤,第2次经微孔滤膜(0.45μm)过滤,得到白三叶叶片水浸提液,母液质量浓度为50g·L⁻¹,保存在4℃冰箱中备用。将母液分别配制成5,25和50g·L⁻¹的处理液,实验前配制,蒸馏水作对照处理。

1.2.2 白三叶叶片水浸提液化学成分分析 取5mL白三叶叶片水浸提液母液加入1mL乙酸乙酯进行

萃取, 吸取 1 μL 萃取液进样, 进行 GC-MS 分析。GC(7890A, Agilent Technologies Company)条件: 色谱: HP-5MS (30 m \times 250 μm \times 0.25 μm); 升温程序: 初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 以 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 180 $^{\circ}\text{C}$, 保持 4 min, 再以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升到 220 $^{\circ}\text{C}$, 保持 15 min; 载气: 氦气(99.99%), 柱流速 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$ 。MS(5975C, Agilent Technologies Company)条件: 电离方式: EI; 电子能量 70 eV; 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$; 四级杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$; 传输线温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 扫描质量范围 28~450。采用 NIST 2008 谱图库兼顾色谱保留时间定性。

1.2.3 园林植物幼苗培养 选取均匀一致、无病虫害的园林植物种子, 用 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高锰酸钾溶液消毒 15 min 后, 取出用蒸馏水反复冲洗(5~6 次)至高锰酸钾完全清除。将消毒后的种子分别置于垫有 2 层滤纸的直径 15 cm 的培养皿中, 放入人工气候箱(HPG-240H)中萌发 3~4 d 后[暗培养, (25 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$], 用消毒后的镊子将刚刚萌发的种子挑出(以胚根突破种皮为准)。采用砂培法进行培养, 在每个培养皿中, 先放入冲洗干净的石英砂, 加入 5 mL Hoagland 营养液[大量元素: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (945.000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), KNO_3 (506.000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), NH_4NO_3 (80.000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 (136.000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 硫酸镁 (493.000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 2.500 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 铁盐溶液: $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5.560 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), EDTANa (7.460 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); 5.000 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 微量元素: KI (0.830 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), HBO_3 (6.200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); MnSO_4 (22.300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ZnSO_4 (8.600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); Na_2MnO_4 (0.250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); CuSO_4 (0.025 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); CoCl_2 (0.025 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)]]; 然后放置 50 粒催芽种子, 各处理组共 20 个处理(3 个质量浓度梯度, 5 种园林植物, 蒸馏水处理作为对照), 将培养皿放入人工气候箱中进行幼苗生长实验。培养条件为光照 14 h(25 $^{\circ}\text{C}$)/黑暗 10 h(20 $^{\circ}\text{C}$); 光强 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。以后隔 1 d 各补充 3 mL 蒸馏水或相应处理液, 实验重复 3 次。培养 3 周后, 测量幼苗单株苗高和根长, 鲜质量和干质量, 测定根系活力、叶绿素质量分数和各种抗氧化酶活性及丙二醛质量分数, 每个指标重复测定 3 次。

1.2.4 园林植物幼苗指标测定 超氧化物歧化酶(SOD)活性参照 Giannopolitis 等^[15]的方法; 过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性参照 Chance 等^[16]的方法; 丙二醛(MDA)含量参照 Zhang 等^[17]的方法; 蛋白质质量分数参照 Bradford^[18]的方法; 根系活力参照 Knievel^[19]的方法进行测定; 叶绿素: 取 0.2 g 幼苗放入 5 mL 800 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 丙酮溶液中浸提 24 h, 浸提液在 663 nm 和 645 nm 比色, 叶绿素质量分数按照 Arnon^[20]的公式计算。

1.3 数据分析

试验数据采用 Origin 8.0 进行统计处理并作图。

2 结果与分析

2.1 白三叶叶片水浸提液的化学成分分析

白三叶叶片水浸提液样品经乙酸乙酯萃取后进行 GC-MS 分析(图 1), 经 GC-MS 联用仪标准质谱数据库 NIST2008 的计算机检索, 并采用面积归一化法确定了它们的相对百分含量。

鉴定出叶中主要含有 42 种化合物(表 1), 主要成分是 4-羟基-紫罗兰酮 (16.4%), 乙酸异戊酯 (11.0%), 二氢香豆酮 (9.6%), 乙烯基愈创木酚 (7.4%), 喇叭茶醇 (6.4%), 菖蒲酮 (5.5%), 麦芽酚 (4.9%), 紫罗兰酮环氧化物 (4.7%) 和 2-羟基-6-甲基苯甲醛 (4.2%), 合计占到总量的 70.1%。

2.2 白三叶叶片水浸提液对园林植物幼苗生长的影响

不同质量浓度白三叶叶片水浸提液对一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金幼苗生长存在不同的影响(表 2)。低质量浓度(5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)白三叶叶片水浸提液对一串红、香雪球、马蹄金幼苗苗高和根长无明显影响, 对石竹和高羊茅幼苗苗高生长具有显著的抑制作用($P<0.05$); 对其根长生长具有极显著的抑制作用($P<0.01$), 与对照相比分别降低了 35.7% 和 21.4%; 随着白三叶叶片水浸提液质量浓度的提高, 对 5 种植物幼苗苗高和根长的抑制作用逐渐增强; 当质量浓

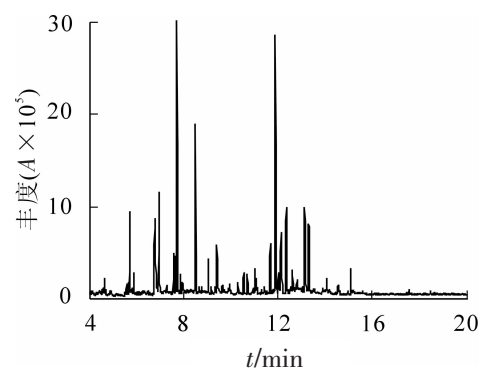


图 1 白三叶叶片水浸提液总离子流图

Figure 1 TIC chromatogram of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens*

表1 白三叶叶片水浸提液化学成分

Table 1 Chemical components of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens*

<i>t</i> /min	化合物	分子式	相对含量/%
5.76	苯酚 phenol	C ₆ H ₆ O	3.9
6.84	乙酸异戊酯 isoamyl acetate	C ₇ H ₁₄ O ₂	11.0
7.00	麦芽酚 maltol	C ₆ H ₆ O ₃	4.9
7.32	苯甲酸 benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	0.8
7.71	3-甲基茛苈 3-methylindene	C ₁₀ H ₁₀	1.6
7.76	二氢香豆酮 dihydrocoumarone	C ₈ H ₈ O	9.6
7.89	5-氨基-2-甲氧基苯酚 5-amino-2-methoxyphenol	C ₇ H ₉ NO ₂	0.7
7.98	苯乙酸 benzeneacetic acid	C ₈ H ₈ O ₂	0.7
8.19	对苯二酚 hydroquinone	C ₆ H ₆ O ₂	0.5
8.53	乙烯基愈创木酚 p-vinylguaiaacol	C ₉ H ₁₀ O ₂	7.4
8.79	二甲氧基苯酚 syringol	C ₈ H ₁₀ O ₃	0.2
9.21	异香兰素 isovanillin	C ₈ H ₈ O ₃	0.4
9.36	对羟基苯乙醇 tyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	0.6
9.44	2-羟基-6-甲基苯甲醛 benzaldehyde, 2-hydroxy-6-methyl-	C ₈ H ₈ O ₂	4.2
9.67	间氨基苯乙醚 m-phenetidine	C ₈ H ₁₁ NO	0.6
9.90	布枯樟脑 diosphenol	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	0.3
9.98	2-甲基十一醛 undecanal, 2-methyl-	C ₁₂ H ₂₄ O	0.8
10.33	橄榄醇 olivetol	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	0.7
10.57	二氢猕猴桃(醇酸)内酯 dihydroactinidiolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	1.3
10.71	乙酰藜芦酮 acetoveratrone	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	1.5
10.91	石竹烯氧化物 caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	0.3
10.96	异戊酸香叶酯 geranyl isovalerate	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0.4
11.05	酞酸二乙酯 diethyl phthalate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1.4
11.10	紫罗(兰)酮 ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	1.1
11.44	香橙烯氧化物 aromadendrene oxide-	C ₁₅ H ₂₄ O	0.7
11.69	3-氧代-紫罗兰酮 3-oxo-ionone	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	2.8
11.80	2,4,6-三甲氧基甲苯 toluene, 2,4,6-trimethoxy-	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	0.3
11.91	4-羟基-紫罗兰酮 4-hydroxy-ionone	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	16.4
12.03	丙烯酸月桂酯 lauryl acrylate	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	1.3
12.14	紫罗兰酮环氧化物 ionone epoxide	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	4.7
12.36	菖蒲酮 shyobunone	C ₁₅ H ₂₄ O	5.5
12.44	雪松醇 cedrol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.3
12.55	百里醌 thymoquinone	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0.8
12.63	反式红没药烯环氧化物 trans-Z- bisabolene epoxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1.1
12.82	3-薷-4-乙酰基 3-carene, 4-acetyl-	C ₁₂ H ₁₈ O	1.2
13.04	羟基醚韦得醇 widdrol hydroxyether	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0.4
13.14	喇叭茶醇 palustrol	C ₁₅ H ₂₆ O	6.4
13.89	八仙花甙 hydrangin	C ₉ H ₆ O ₃	0.7
14.00	樟脑肟 camphor oxime	C ₁₀ H ₁₇ NO	0.4
14.06	乙酸香草酯 vanillin, acetate	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	1.2
14.55	乙基乙酸香叶酯 ethyl geranyl acetate	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	0.7
14.95	羟基月桂酸 hydroxylauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	0.4

度增加到 25 g·L⁻¹ 时, 对一串红、香雪球、石竹和高羊茅等幼苗根生长的抑制作用达到极显著水平 ($P < 0.01$), 与对照相比分别降低了 30.1%, 57.7%, 35.5% 和 27.6%; 当质量浓度增大到 50 g·L⁻¹ 时, 对一串红、石竹和高羊茅幼苗苗高生长的抑制作用达到极显著水平 ($P < 0.01$), 与对照相比分别降低了 24.9%, 49.0% 和 32.5%, 对香雪球和马蹄金幼苗苗高具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 与对照相比其抑

表 2 白三叶叶片水浸提液对园林植物幼苗生长的影响

Table 2 Effects of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens* on seedling growth of five garden plants

受试植物	处理/(g·L ⁻¹)	苗高/cm	根长/cm	鲜质量/(mg·株 ⁻¹)	干质量/(mg·株 ⁻¹)
一串红	对照	3.79 ± 0.45	3.27 ± 1.05	57.73 ± 8.70	3.48 ± 0.61
	5	3.57 ± 0.54	3.23 ± 0.99	52.19 ± 9.62	2.99 ± 0.65*
	25	3.16 ± 0.44*	2.26 ± 0.52**	44.36 ± 10.33**	3.08 ± 0.54*
	50	2.84 ± 0.43**	2.16 ± 0.86**	43.93 ± 1.51**	3.08 ± 0.57*
香雪球	对照	4.70 ± 0.26	2.60 ± 0.50	32.11 ± 1.39	3.43 ± 0.13
	5	4.60 ± 0.40	2.10 ± 0.36*	25.99 ± 1.59*	2.59 ± 0.32**
	25	3.93 ± 0.81*	1.10 ± 0.46**	14.41 ± 0.80**	1.42 ± 0.12**
	50	3.80 ± 0.42*	1.70 ± 0.40**	13.64 ± 0.42**	1.44 ± 0.27**
石竹	对照	5.12 ± 0.49	2.47 ± 0.82	32.77 ± 7.14	2.88 ± 0.64
	5	4.35 ± 0.77*	1.59 ± 0.39**	30.51 ± 8.81	2.63 ± 0.65
	25	2.86 ± 0.52**	1.60 ± 0.70**	22.36 ± 10.35**	1.93 ± 0.86**
	50	2.61 ± 0.74**	1.50 ± 0.74**	16.32 ± 8.81**	1.44 ± 0.88**
高羊茅	对照	12.61 ± 2.01	6.22 ± 1.55	15.42 ± 2.65	2.93 ± 0.27
	5	10.67 ± 2.11*	4.89 ± 1.16**	12.85 ± 1.31*	2.43 ± 0.48*
	25	9.41 ± 2.19**	4.51 ± 1.50**	11.61 ± 1.25**	2.12 ± 0.32**
	50	8.51 ± 2.65**	4.27 ± 1.88**	11.17 ± 1.60**	2.33 ± 0.52**
马蹄金	对照	3.52 ± 0.67	2.33 ± 1.04	28.21 ± 1.54	3.09 ± 0.46
	5	3.82 ± 0.88	2.59 ± 0.73	27.35 ± 1.06	2.89 ± 0.24
	25	3.42 ± 1.02	2.27 ± 1.12	26.44 ± 1.65	2.53 ± 0.12*
	50	3.13 ± 0.77*	2.01 ± 0.83*	24.11 ± 4.76*	2.17 ± 0.24**

说明：* 为 $P < 0.05$ ，差异显著；** 表示 $P < 0.01$ ，差异极显著。

制率为 19.2% 和 11.1%。

由表 2 可以看出：低质量浓度 (5 g·L⁻¹) 白三叶叶片水浸提液仅对香雪球幼苗干质量有极显著抑制作用，比对照降低了 24.6% ($P < 0.01$)；当质量浓度达到 50 g·L⁻¹ 时，对马蹄金幼苗鲜质量呈显著抑制作用 ($P < 0.05$)，对一串红、香雪球、石竹和高羊茅等幼苗鲜质量的抑制作用呈极显著水平 ($P < 0.01$)，与对照相比其抑制率分别为 23.9%，57.5%，50.2% 和 27.6%；对香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等幼苗干质量的抑制作用呈极显著水平 ($P < 0.01$)，抑制率分别为 57.9%，49.8%，20.3% 和 29.9%，对一串红幼苗干质量的抑制作用呈显著水平 ($P < 0.05$)，与对照相比降低了 11.5%。

2.3 白三叶叶片水浸提液对 5 种园林植物幼苗叶绿素质量分数的影响

低质量浓度白三叶叶片水浸提液对一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金幼苗叶绿素质量分数无明显影响；当白三叶叶片水浸提液增加到 50 g·L⁻¹ 时，与对照相比，一串红和马蹄金幼苗叶绿素质量分数分别降低了 13.6% 和 13.8% ($P < 0.05$)，香雪球、石竹和高羊茅等幼苗叶绿素分别下降了 43.1%，30.5% 和 57.1% ($P < 0.01$) (图 2)。

2.4 白三叶叶片水浸提液对 5 种园林植物幼苗根系活力的影响

低质量浓度 (5 g·L⁻¹) 白三叶叶片水浸提液仅对石竹幼苗根系活力具有显著的抑制作用 (图 3)，与对照相比降低了 20.2% ($P < 0.05$)，对其他 4 种植物幼苗根系活力无明显影响；当质量浓度增加到 50 g·L⁻¹ 时，对一串红、香雪球、石竹等幼苗根系活力的抑制作用呈极显著水平 ($P < 0.01$)，与对照相比分别降低了 24.0%，42.8% 和 51.6%，对高羊茅和马蹄金幼苗根系活力具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$)，与对照相比其抑制率分别为 16.1% 和 14.9%。

2.5 白三叶叶片水浸提液对 5 种园林植物幼苗体内抗氧化酶活性的影响

2.5.1 对 5 种园林植物幼苗体内过氧化物酶 (POD) 活性影响 当白三叶叶片水浸提液质量浓度为 25 g·

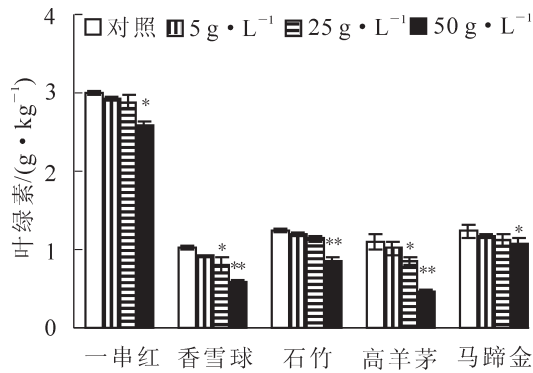


图2 白三叶叶片水浸提液对园林植物叶绿素质量分数的影响

Figure 2 Effects of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens* on chlorophyll content of garden plants

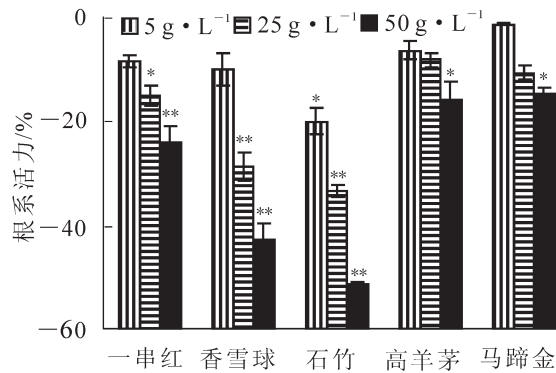


图3 白三叶叶片水浸提液对园林植物根系活力的影响

Figure 3 Effects of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens* on roots activity of garden plants

L^{-1} 时, 一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等幼苗体内过氧化物酶活性表现出极显著的增加($P < 0.01$), 与对照相比过氧化物酶活性分别提高了34.5%, 62.8%, 110.0%, 69.4%和40.4%(图4); 随着白三叶叶片水浸提液质量浓度的增加, 过氧化物酶活性开始极显著下降($P < 0.01$), 与最高值相比, 一串红、香雪球、石竹和高羊茅幼苗过氧化物酶活性分别降低了20.4%, 53.9%, 52.6%和36.5%, 马蹄金幼苗过氧化物酶活性无明显变化。

2.5.2 对5种园林植物幼苗体内超氧化物歧化酶活性影响 白三叶叶片水浸提液对5种植物幼苗体内超氧化物歧化酶活性的作用表现得更为明显(图5)。25 $g \cdot L^{-1}$ 白三叶叶片水浸提液使一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等幼苗体内超氧化物歧化酶活性表现出极显著增高($P < 0.01$), 与对照相比, 超氧化物歧化酶活性分别增加了56.2%, 65.9%, 37.5%, 100.0%和96.9%。当质量浓度增加到50 $g \cdot L^{-1}$ 时, 对香雪球、石竹幼苗超氧化物歧化酶活性表现出抑制作用, 与对照相比超氧化物歧化酶活性分别降低了25.8%和39.6%。

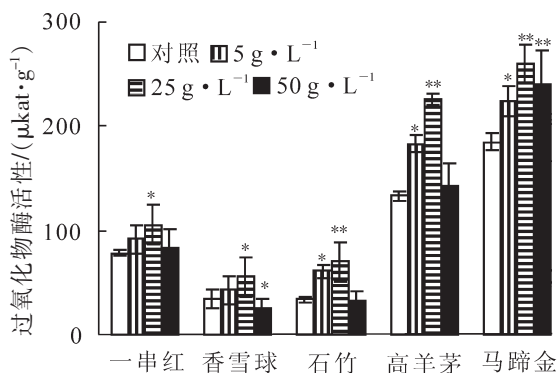


图4 白三叶叶片水浸提液对园林植物幼苗过氧化物酶活性的影响

Figure 4 Effects of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens* on POD activity of garden plants

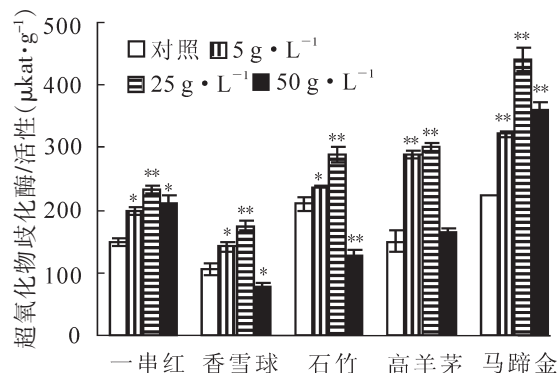


图5 白三叶叶片水浸提液对园林植物幼苗超氧化物歧化酶活性的影响

Figure 5 Effects of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens* on SOD activity of garden plants

2.5.3 对5种园林植物幼苗体内过氧化氢酶活性影响 随着白三叶叶片水浸提液质量浓度的增加, 5种植物幼苗体内过氧化氢酶活性呈先显著上升后显著下降(图6)。当浸提液质量浓度为25 $g \cdot L^{-1}$ 时, 一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等5种植物幼苗体内过氧化氢酶活性表现出极显著的促进作用, 与对照相比过氧化氢酶活性分别增加了0.5, 1.0, 0.4, 1.7和1.4倍; 当质量浓度增加到50 $g \cdot L^{-1}$ 时, 过氧化氢酶活性明显下降, 与最高值相比, 一串红、马蹄金幼苗体内过氧化氢酶活性分别降低了13.5%和10.8%($P < 0.05$), 香雪球、石竹和高羊茅等幼苗体内过氧化氢酶活性分别降低了61.2%, 48.4%和51.3%($P < 0.01$)。

2.6 对5种园林植物幼苗体内丙二醛影响

香雪球、石竹和高羊茅幼苗在 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度白三叶叶片水浸提液处理下，膜脂过氧化明显增加 ($P < 0.05$)，显示植物在此时受到伤害(图7)；当白三叶叶片水浸提液质量浓度增加到 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等幼苗的膜脂过氧化程度明显加重，与对照相比其丙二醛摩尔质量浓度分别增加了0.4, 1.8, 1.9, 1.4和0.5倍。

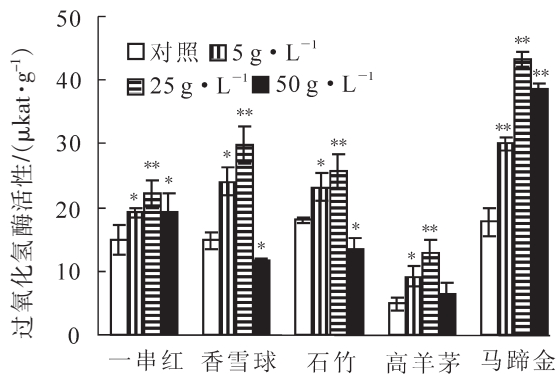


图6 白三叶叶片水浸提液对植物幼苗过氧化氢酶活性的影响

Figure 6 Effects of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens* on CAT activity of garden plants

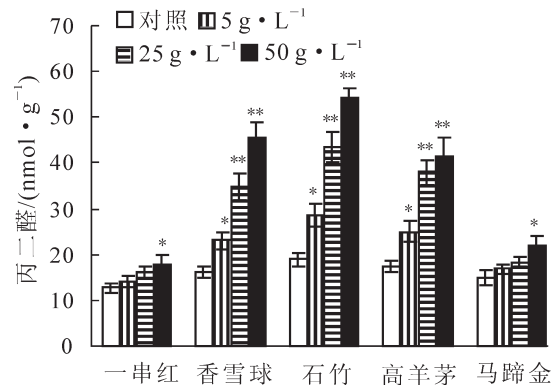


图7 白三叶叶片水浸提液对植物幼苗丙二醛摩尔质量浓度的影响

Figure 7 Effects of aquatic extracts from leaves of *Trifolium repens* on MDA content of garden plants

3 讨论

对5种植物幼苗的生长实验结果表明：不同质量浓度的白三叶叶片水浸提液对一串红、香雪球、石竹和高羊茅等幼苗高和根生长具有抑制作用，并随着浸提液质量浓度的增加抑制作用增强(表2)；对马蹄金幼苗高和根生长表现为低促进高抑制的现象。相同质量浓度白三叶叶片水浸提液对5种植物幼苗根部的影响均大于地上部分，出现这种现象的原因可能是因为根为直接接触化感物质的器官，较地上部分更容易受到伤害；而地上部分靠根部吸收的营养物质来满足自身发展，所以只有当根系受害达到一定程度时，地上部分才可以表现出明显的受害症状^[21]。白三叶叶片水浸提液对受试植物的抑制效应还与其质量浓度有关，即随着叶片水浸提液质量浓度的增加，抑制作用也增强。

本实验中，一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等幼苗体内叶绿素质量分数随着白三叶叶片水浸提液质量浓度的增加表现出不同程度的下降(图2)，这可能是因为植物幼苗细胞膜受到损伤后，叶片内叶绿素合成受阻，叶绿素质量分数降低，光合效率减弱。超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶是植物在受到胁迫时防止膜脂氧化的内源保护酶，在三者共同协调作用时，可以有效清除代谢过程中所产生的活性氧，防止其引起的膜脂过氧化及其他伤害。一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等的3种保护酶活性随白三叶叶片水浸提液质量浓度增加表现出不同的升降变化(图4~6)，低质量浓度白三叶叶片水浸提液可以使园林植物幼苗体内保护酶活性显著上升，这种现象可能是由于其感受到化学胁迫后，植物自身启动的一种应对保护机制^[22]，但这种反应只能够在一定程度内发挥作用。随着叶片水浸提液质量浓度的增大，受试植物幼苗体内氧化产物累计到一定水平，导致体内保护酶显著下降，幼苗体内在胁迫下生成的氧自由基不能得到及时清除，致使植物幼苗受害逐渐加重。丙二醛是生物膜系统脂质过氧化产物之一，其摩尔质量分数高低指示脂质过氧化强度和膜系统的伤害程度^[23]。在本实验中，当植物幼苗体内保护性酶活性较高时，其体内丙二醛较低，植物幼苗受害程度较轻；当植物幼苗体内保护性酶活性降低时，丙二醛升高，植物幼苗受到伤害程度增强(图7)。通过实验可以得出丙二醛的分析结果与保护酶活性的分析结果相吻合。

迄今为止所发现的化感物质(allelochemical)几乎都是植物的次生代谢物质，分子量较小，结构简单，其中酚类和萜类化合物是高等植物中最为常见的化感物质^[24]。萜类化合物广泛以挥发油形式存在于高等植

物中,起到保护自己吸引昆虫的功效,当这些物质进入环境后会对其他植物产生化感作用^[25]。植物放出的萜类化合物的毒性具有选择性,高浓度下表现为对植物发芽和生长的抑制,且随着化感物质浓度增大抑制作用逐渐加强,而低浓度下也具有促进生长的作用^[26],这与本研究的结果相符。有研究发现,许多菊科 Asteraceae 植物含有大量的挥发性萜类化合物,如柠檬烯、蒎烯、樟脑、长叶薄荷酮、桉树脑、香茅醇等,它们不仅保护植物自身不受侵害外,还对其他植物生长产生抑制作用。Muller 等^[27]指出加州蒿 *Artemisia californica* 和鼠尾草属 *Salvia* spp. 植物的叶中含有丰富的挥发性萜类物质桉树脑和樟脑,它们能被雨露带入土壤中,从而抑制了其他草本植物种子的萌发和幼苗生长,从而形成裸带。Abdul 等^[28]研究发现,苜蓿根系和残茬能够释放酚酸类物质,如咖啡酸、绿原酸、异绿原酸、香豆酸、羟基苯甲酸和阿魏酸,能抑制白茅 *Imperata cylindrical* 生长。汪思龙等^[29]研究表明,肉桂酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸等都能够对叶绿素造成伤害,随着酚类物质浓度的升高,叶绿素的含量更低。白三叶叶片水浸提液主要含有酚类与萜类化合物,其中 4-羟基-紫罗兰酮、乙酸异戊酯、二氢香豆酮、乙烯基愈创木酚、喇叭茶醇、菖蒲酮、麦芽酚、紫罗兰酮环氧化物、2-羟基-6-甲基苯甲醛等 9 种化合物,合计占到总量的 70.1%,它们可能是白三叶体内抑制园林植物生长的化感物质。

化感作用在外来植物入侵过程中可能发挥重要的作用,外来植物通过释放化感物质改变植物生境影响本地植物的生长^[30],这种效果可能是本地植物对入侵植物释放化感物质的敏感性使外来植物成功入侵^[31]。本研究表明:白三叶可能通过释放化感物质抑制一串红、香雪球、石竹、高羊茅和马蹄金等的生长和生理生化代谢,推测白三叶的化感作用是其成功入侵的机制之一。

参考文献:

- [1] 翟明普,贾黎明.森林植物间的他感作用[J].北京林业大学学报,1993,15(3):138-147.
ZHAI Mingpu, JIA Liming. Allelopathy of forest plants [J]. *J Beijing For Univ*, 1993, 15(3): 138-147.
- [2] 朱丽,马克平.洲际入侵植物生态位稳定性研究进展[J].生物多样性,2010,18(6):547-558.
ZHU Li, MA Keping. On the niche stasis of intercontinental invasive plants [J]. *Biodiversity Sci*, 2010, 18(6): 547-558.
- [3] 孔垂华.植物化感作用研究中应注意的问题[J].应用生态学报,1998,9(3):332-336.
KONG Chuihua. Problems needed attention on plant allelopathy research [J]. *Chin J Appl Ecol*, 1998, 9(3): 332-336.
- [4] 杨明攀,吕霞,张婷,等.入侵植物紫茎泽兰化感作用及其途径研究[J].植物分类与资源学报,2011,33(2):209-213.
YANG Mingzhi, LÜ Xia, ZHANG Ting, et al. Allelopathic potential and pathway of an invasive weed *Eupatorium adenophorum* (Asteraceae) [J]. *Plant Diversity & Resour*, 2011, 33(2): 209-213.
- [5] 王大力,祝心如.豚草的化感作用研究[J].生态学报,1996,16(1):11-19.
WANG Dali, ZHU Xinru. Research on allelopathy of *Amerosia artemisiifolia* [J]. *Acta Ecol Sin*, 1996, 16(1): 11-19.
- [6] 梁斌,袁亚莉,谷文祥,等.薇甘菊化感作用的初步研究[J].杂草科学,2006(1):21-23.
LIANG Bin, YUAN Yali, GU Wenxiang, et al. Preliminary research on allelopathy of *Mikamia micrantha* [J]. *Weed Sci*, 2006(1): 21-23.
- [7] 林淳,刘国坤.外来入侵植物五爪金龙(*Ipomoea cairica*)的研究进展[J].亚热带农业研究,2008,4(3):177-180.
LIN Chun, LIU Guokun. Progress in studies on the exotic invasive plant five-fingered morning glory *Ipomoea cairica* (L.) Sweet [J]. *Subtrop Agric Res*, 2008, 4(3): 177-180.
- [8] 梅玲笑,陈欣,唐建军.外来杂草加拿大一枝黄花对入侵地植物的化感效应[J].应用生态学报,2005,16(12):2379-2382.
MEI Lingxiao, CHEN Xin, TANG Jianjun. Allelopathic effects of invasive weed *Solidago canadensis* on native plants [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2005, 16(12): 2379-2382.
- [9] AGARWAL A R, GAHLOT A, VERMA R, et al. Effects of weed extracts on seedling growth of same varieties of wheat [J]. *J Environ Biol*, 2002, 23: 19-23.

- [10] BAIS H P, VEPACHEDU R, GILROY S. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions [J]. *Science*, 2003, **301**: 1377 – 1380.
- [11] RIDENOUR W M, CALLAWAY R M. The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass [J]. *Oecologia*, 2001, **126**: 444 – 450.
- [12] PANDEY D K. Inhibition of salvinia (*Salvinia molesta* Mitchell) by parthenium (*Parthenium hysterophorus*) (II) Relative effect of flower, leaf, stem, and root residue on salvinia and paddy [J]. *J Chem Ecol*, 1994, **20**: 3123 – 3131.
- [13] 徐海根, 强胜. 中国外来入侵物种编目[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 183 – 191.
- [14] 谢苑, 高素萍. 白三叶水浸液对高羊茅种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, **36**(9): 3616 – 3618.
XIE Yuan, GAO Suping. Effect of *Trifolium repens* infusion on the seed germination and seedling growth of *Festuca arundinacea*[J]. *J Anhui Agric Sci*, 2008, **36**(9): 3616 – 3618.
- [15] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutase (I) occurrence in higher plants [J]. *Plant Physiol*, 1977, **59**: 309 – 314.
- [16] CHANCE B, MAEHLI A C. Assay of catalase and peroxidase [J]. *Method Enzymol*, 1955, **2**: 764 – 775.
- [17] ZHANG Jingxian, KIRKHAM M B. Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species [J]. *Plant Cell Physiol*, 1994, **35**: 785 – 791.
- [18] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein: dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 – 254.
- [19] KNEVEL D P. Procedures for estimating ratio of live to dead root dry matter in root core samples [J]. *Crop Sci*, 1973, **13**: 124 – 126.
- [20] ARNON D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1949, **24**: 1 – 15.
- [21] CHON S U, CHOIB S K, JUNG S. Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass [J]. *Crop Prot*, 2002, **21**: 1077 – 1082.
- [22] DING Ju, SUN Yao, XIAO Chunlan, *et al.* Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid [J]. *J Exp Bot*, 2007, **58**(13): 3765 – 3773.
- [23] BANERJEE B D, SETH V, BHATTARYA A. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers [J]. *Toxicol Let*, 1999, **107**: 33 – 47.
- [24] INDERJIT, NILSEN E T. Bioassay and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2000, **22**: 221 – 238.
- [25] 胡飞, 孔垂华. 胜红蓟化感作用研究(VI)气象条件对胜红蓟化感作用的影响[J]. 应用生态学报, 2002, **13**(1): 76 – 80.
HU Fei, KONG Chuihua. Allelopathy of *Ageratum conyzoides* (VI) Effects of meteorological conditions on allelopathy of *Ageratum conyzoides* [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2002, **13**(1): 76 – 80.
- [26] 方芳, 茅玮, 郭水良. 入侵杂草一年蓬的化感作用研究[J]. 植物研究, 2005, **25**(4): 449 – 452.
FANG Fang, MAO Wei, GUO Shuiliang. Study on allelopathic effects of the invasive plant annual fleabane [J]. *Bull Bot Re*, 2005, **25**(4): 449 – 452.
- [27] MULLER C H. Inhibitory terpenes volatilized from *Salvia* shrubs Bull [J]. *Torrey Bot Club*, 1965, **92**: 38.
- [28] ABDUL R A, HABIB S A. Allelopathic effect of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on bladygrass (*Imperata cylindrica*) [J]. *J Chem Ecol*, 1989, **16**: 2289 – 2300.
- [29] 汪思龙, 陈龙池, 廖利平, 等. 几种化感物质对杉木幼苗生长的影响[J]. 应用与环境生态学报, 2002, **8**(6): 588 – 591.
WANG Silong, CHEN Longchi, LIAO Liping, *et al.* Effects of three kinds of allelochemicals on growth of Chinese fir seedlings [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2002, **8**(6): 588 – 591.
- [30] 杨琴琴, 缪丽华, 洪春桃, 等. 香菇草水浸提液对 3 种植物种子萌发和幼苗生长的化感效应[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(3): 354 – 358.
YANG Qinqin, MIAO Lihua, HONG Chuntai, *et al.* Allelopathic effects of *Hydrocotyle vulgavis* extract on seed germination and seedling growth [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, **30**(3): 354 – 358.
- [31] MEINERS S J, KONG C H, LADWIG L M, *et al.* Developing an ecological context for allelopathy [J]. *Plant Ecol*, 2012, **213**(8): 1221 – 1227.